

# 心臓形態形成における機械的刺激による転写制御機構の解析

著者	柿崎 周平
号	78
学位授与番号	2653
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/45879">http://hdl.handle.net/10097/45879</a>

氏 名（本籍）	かき 柿      さき 崎      しゅう 周      へい 平
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 6 5 3 号
学位授与年月日	平 成 21 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	心臓形態形成における機械的刺激による転写制御 機構の解析

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 土 屋      滋      教授 小 椋 利 彦
	教授 仲 村 春 和      教授 五十嵐 和 彦

# 論文内容要旨

複雑な三次元構造からなる心臓は、時間的・空間的に秩序だった多くの過程により形成され、全身へ血液を循環させる重要な臓器である。近年、遺伝子改変技術を用いた分子生物学的研究が進歩し、心臓発生には様々な分泌因子や転写因子などが関与していることが明らかとなり、それらの分子機構の解析が行われている。

当研究室（加齢医学研究所・神経機能情報研究分野）では心臓発生に関与する転写因子、特に T ボックス型転写因子である Tbx5 について以前より研究が行われている。Tbx5 は原始心筒形成前からすでに発現し、心房、心室の形成に関わっていることが知られ、他の心臓転写因子である Nkx2.5 や GATA4 と複合体を形成し、心臓に発現する標的遺伝子の転写を促進することが明らかにされている。当研究室ではその標的遺伝子の一つである Nppa (Natriuretic peptide precursor type A) のプロモーターを利用したルシフェラーゼアッセイで、Tbx5 のコアクチベーターの探索を行った。その結果、Tbx5 と MRTF-B (Myocardin-related transcription factor-B) の両存在下で Nppa に強い転写活性を持つことが示されていた。

MRTF-B は Myocardin family に属する転写活性因子の一つで、主に、血管内皮や心臓流出路に発現している。培養細胞を用いた研究では、MRTF-B は細胞質に局在しているが、活性型 RhoA や血清応答因子 (SRF; serum response factor) の刺激で核へ移行するという特徴を持っている。このメカニズムは、RhoA や SRF の刺激がアクチンを介した細胞骨格のリモデリングを引き起こし、その結果、細胞質から核へ移行することが証明されている。また、細胞骨格のリモデリングは物理的な刺激に対しても反応することが知られている。

心臓発生において、機械的刺激（メカニカルストレス）がエピジェネティックな因子として重要な役割を果たすことが報告されている。すなわち、心臓の発生過程で心臓内に流れる血流を阻害すると正常な心臓が形成されない、心臓の拍動がないゼブラフィッシュ変異体では正常な房室弁の形成が認められない、等である。しかしながら、それらエピジェネティックな因子である機械的刺激が細胞へどのように情報を伝達しているか、細胞外からの物理信号を細胞内の転写制御に変換するメカニズムは不明のまま残されている。本研究では MRTF-B が心臓発生における物理的刺激、つまり心臓の拍動により細胞内局在を変化させるのではないかと、心拍動により制御される MRTF-B が Tbx5 とともに心臓形態形成に関与しているのではないかと、という点に着目し検証を行った。本研究では Tbx5 が MRTF-B と核内において蛋白複合体を形成し、心筋分化マーカーである Nppa の転写を促進させることを明らかにした。また、培養細胞に伸展刺激を行うと MRTF-B は細胞質から核へ移行し、物理的刺激が MRTF-B の核移行を制御していることを示した。さらに、ゼブラフィッシュ胚を用いた実験から、心拍動という物理的刺激がアクチン骨格

のリモデリング（ファイバーアクチンの形成）を引き起こし、その結果、MRTF-Bの核内移行を促進していることを明らかにした。

本研究では心臓発生期における機械的刺激の受容系/反応系（mechano-transduction）の分子実態を一部明らかにし、メカニカルストレスが正常な心臓の形成に必要であることを示した。

## 審査結果の要旨

複雑な三次元構造からなる心臓は、時間的・空間的に秩序だった多くの過程により形成され、全身へ血液を循環させる重要な臓器である。近年、遺伝子改変技術を用いた分子生物学的研究が進歩し、心臓発生には様々な分泌因子や転写因子などが関与していることが明らかとなり、それらの分子機構の解析が行われている。著者は、ゼブラフィッシュを用いた心臓発生系を用い、心臓の分子機構を検索した。

（研究の背景）1. 著者の学ぶ研究室では、心臓発生に関与する転写因子、特に T ボックス型転写因子である Tbx5 について以前より研究が行われている。Tbx5 は原始心筒形成前からすでに発現し、心房、心室の形成に関わっていることが知られ、他の心臓転写因子である Nkx2.5 や GATA4 と複合体を形成し、心臓に発現する標的遺伝子の転写を促進することが明らかにされている。Tbx5 は MRTF-B (Myocardin-related transcription factor-B) の存在下で、Nppa (Natriuretic peptide precursor type A) に強い転写活性を持つことが示されていた。

2. MRTF-B は Myocardin family に属する転写活性因子の一つで、主に、血管内皮や心臓流出路に発現している。培養細胞を用いた研究では、MRTF-B は細胞質に局在しているが、活性型 RhoA や血清応答因子 (SRF; serum response factor) の刺激で核へ移行するという特徴を持っている。このメカニズムは、RhoA や SRF の刺激がアクチンを介した細胞骨格のリモデリングを引き起こし、その結果、細胞質から核へ移行することが証明されている。また、細胞骨格のリモデリングは物理的な刺激に対しても反応することが知られている。

3. 心臓発生において、機械的刺激（メカニカルストレス）がエピジェネティックな因子として重要な役割を果たすことが報告されている。すなわち、心臓の発生過程で心臓内に流れる血流を阻害すると正常な心臓が形成されない、心臓の拍動がないゼブラフィッシュ変異体では正常な房室弁の形成が認められない。

（目的） エピジェネティックな因子である機械的刺激が細胞へどのように情報を伝達しているか、細胞外からの物理信号を細胞内の転写制御に変換するメカニズムは不明のまま残されている。本研究では MRTF-B が心臓発生における物理的刺激、つまり心臓の拍動により細胞内局在を変化させるのではないかと、心拍動により制御される MRTF-B が Tbx5 とともに心臓形態形成に関与しているのではないかと、という点に着目し検証を行った。

（結果） 本研究では Tbx5 が MRTF-B と核内において蛋白複合体を形成し、心筋分化マーカーである Nppa の転写を促進させることを明らかにした。また、培養細胞に伸展刺激を行うと MRTF-B は細胞質から核へ移行し、物理的刺激が MRTF-B の核移行を制御していることを示した。さらに、ゼブラフィッシュ胚を用いた実験から、心拍動という物理的刺激がアクチン骨格のリモデリング（ファイバーアクチンの形成）を引き起こし、その結果、MRTF-B の核内移行を促進していることを明らかにした。

本研究では心臓発生期における機械的刺激の受容系/反応系 (mechano-transduction) の分子実態の一部を明らかにし、メカニカルストレスが正常な心臓の形成に必要であるという極めて重要な概念を確認し、学位に十分値する研究であると判断された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。